OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES

INTERNATIONAL OFFICE
OF EPIZOOTICS



OFICINA INTERNACIONAL
DE EPIZOOTIAS

Organisation Intergouvernementale
créée à Paris par l'Arrangement International
du 25 Janvier 1924

BULLETIN

TOME LXXI — NUMÉROS 1-2 — JANVIER-FÉVRIER 1969

OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES
12, rue de Prony
PARIS (17e)

Bull. Off. int. Epiz., 1969, 71 (1-2), 155-165.

Etude des variantes modifiées du virus aphteux

par

V. A. SERGUEIEV, N. N. DRIAGALINE, V. P. ONOUFRIEV et A. SIOUSIOUKINE (*).

Ces dernières années, l'attention de nombreux chercheurs a été centrée sur les problèmes de l'étude des causes et des mécanismes de la mutabilité du virus de la Fièvre aphteuse et surtout sur le problème des virus-vaccins.

A l'heure actuelle, on peut considérer comme fermement établi que l'atténuation du virus aphteux peut être obtenue par des passages sur des organismes d'animaux naturellement réfractaires à la Fièvre aphteuse, sur des embryons de poulet, et aussi sur différentes cultures de cellules. La méthode de la sélection et de la mutabilité par adaptation constitue jusqu'à maintenant la principale façon d'obtenir des souches modifiées du virus aphteux. De nombreuses recherches ont établi que la vitesse de l'atténuation dépendait pour une grande part des particularités individuelles des souches utilisées pour les recherches, du système employé pour les passages du virus, des méthodes de sélection appliquées. Il a été établi que les passages du virus dans n'importe quel système entraînent une diminution progressive de son activité immunogène, allant jusqu'à la disparition totale de cette dernière. Le nombre des passages où le virus conserve son avirulence et un pouvoir immunogène suffisant diffère suivant les souches et peut varier entre 4 ou 5 et 60 passages, ou même davantage. Les expériences utilisant en période d'épizootie divers virus-vaccins ont montré leur efficacité.

(*) Institut de Recherche Scientifique sur la Fièvre Aphteuse du Ministère de l'Agriculture de l'U.R.S.S., Vladimir.

Nos recherches ont eu pour principal objet d'obtenir des variantes atténuées du virus aphteux et d'étudier leurs propriétés biologiques.

Ce faisant, nous avons étudié l'influence du système de culture, de la température de la culture, des méthodes de sélection sur le déroulement du processus d'atténuation du virus.

On a utilisé pour les recherches les souches 550 et 663 du virus A_{22} et la souche OP-13 du virus de type O.

L'atténuation de la souche 550 a été obtenue par des passages sur des lignées croisées de cellules rénales de l'embryon de porc (SPEV), sur une culture monocellulaire rénale de bovin (BP) et sur des souris d'âge progressivement croissant.

La souche 663 a été atténuée dans une culture de cellules rénales de bovin, dans une culture monocellulaire rénale de lapin (Krp) et dans une lignée croisée de cellules rénales de porcelet.

La souche OP-13 n'a été atténuée que dans une culture de cellules de bovin.

Aux différentes étapes du passage du virus aphteux dans la culture de cellules, on a abaissé progressivement la température de la culture (+ 37°, + 30°, + 24° C).

Les propriétés du virus au cours du passage, ainsi que celles des clones isolés, ont été étudiées selon les indices suivants : Vg (pouvoir pathogène pour les cobayes), Vm (pouvoir pathogène pour les souris adultes et les souris âgées de sept jours), Vb (pouvoir pathogène pour les bovins), S (importance des colonies négatives), rct (aptitude du virus à proliférer sous différentes températures), T_{55} (stabilité à la température de 55° C) et *p*H 6,4 (stabilité au *p*H 6,4).

La virulence pour les bovins des variantes modifiées a été contrôlée en inoculant le virus dans l'épithélium lingual ou sous la peau.

Les propriétés immunogènes des variantes modifiées du virus aphteux ont été contrôlées sur des bovins et des ovins, vaccinés par voie hypodermique à la dose de $10^{6,0}$-$10^{7,0}$ $DICT_{50}$ ou DL_{50}. Dix-huit à vingt et un jours plus tard, les animaux vaccinés étaient contaminés par inoculation dans l'épithélium lingual du virus aphteux épizootique (10^4 DL_{50}).

Les recherches effectuées sur les souches sus-mentionnées ont montré que les passages sur cultures croisées de cellules,

sur cellules rénales de lapin ou sur souris ont favorisé une modification plus rapide du virus que sur les cultures de BP, cependant que la durée du processus était beaucoup moins importante à basse température (Tabl. I et II).

Lors du passage du virus dans les cultures cellulaires, son pouvoir pathogène diminuait constamment pour les cobayes et les bovins. Au fur et à mesure de l'accroissement des passages, surtout à basse température, le virus provoquait chez les cobayes des aphtes primaires (±), le plus souvent de

TABLEAU I

Influence du système et de la température de la culture sur les propriétés biologiques du virus aphteux (*souche* 550).

ESPÈCE de système	PASSAGES	TEMPÉRATURE de la culture	INDICES					
			Vg	Vm	VM	rct 40	S	Vb
BP	Initial	37	+	+	—	+	B	+
	80	37	+	+	—	+	B	+
	100	30	+	+	—	—	B	+
	80	25	±	+	—	—	B	+
SPEV	Initial	37	+	+	—	+	MB	+
	15	37	+	+	—	+	MB	+
	50	37	±	+	—	+	MB	+
	100	37	±	+	—	+	MB	±
	65	30	±	+	—	—	MB	—
Souris	Initial	Organismes de souris	+	+	—	+	MB	+
	38		+	+	—	+	MB	+
	77		+	+	+	+	MB	—
	95		+	+	+	+	MB	—

Note :
+ : présence de l'indice.
— : absence de l'indice.
MB : petites et grandes plaques.
M : petites plaques.
B : grandes plaques.

caractère abortif, à l'endroit de l'inoculation. On a observé une action analogue du virus chez les bovins. Lors du passage du virus aphteux (souche 550) sur des souris, il a gardé son pouvoir pathogène pour les cobayes, a acquis un myo-

tropisme caractérisé et a simultanément perdu sa virulence pour les bovins (77 à 95 passages).

TABLEAU II

Influence de l'espèce de culture de cellules et de la température du passage sur les propriétés biologiques du virus aphteux (souche 663).

ESPÈCE de culture	TEMPÉRATURE de la culture	PASSAGES	INDICES				
			Vg	Vm	rct 37	rct 40	S
	Initial		+	+	+	+	MB
B.P.	37°	10 70	+ +	+ +	+ +	+ +	MB MB
	30°	10 70	+ +	+ +	+ +	+ +	MB MB
	24°	10 70	+ +	+ +	+ +	+ —	M M
KrP	37°	10 70	+ +	+ +	+ +	+ +	MB MB
	30°	10 70	+ +	+ +	+ +	— —	— —
	24°	30 70	— —	+ —	+ —	— +	— —
PP	37°	10 70	+ +	+ +	+ +	+ +	MB MB
	30°	10 70	± —	+ +	+ +	+ +	— —
	24°	20 50	± —	+ +	+ —	— —	— —

Les passages ultérieurs de la souche 550 dans une culture de SPEV ont favorisé la modification quantitative du nombre des plages grandes et petites dans la population virale. Ainsi, le quinzième passage du virus comptait environ 10 p. 100 de petites plages et 90 p. 100 de grandes plages tandis que le centième passage comptait 96 p. 100 de petites plages et seulement 6 p. 100 de grandes colonies négatives. Dans les autres matériaux, cette loi était moins évidente. Les variantes atténuées étaient moins résistantes que les souches initiales à la température de 55° C et au *p*H 6,4.

Ces dernières années, les chercheurs ont émis l'opinion que la population virale, aux différents niveaux de passage, était composée de particules ayant des propriétés hétéro-gènes.

La sélection expérimentale (par la méthode des colonies négatives et des dilutions extrêmes) permet d'isoler des variantes atténuées à des étapes d'adaptation moins avancées, sans attendre qu'elles soient en majorité dans la population de tel ou tel passage. Les recherches sur les souches 550 et 663 confirment l'hétérogénéité de la population virale aux différentes étapes de l'adaptation, aussi bien dans la culture de SPEV que celle de BP (Tabl. III).

Par ailleurs, les basses températures de culture ont favorisé la sélection de clones possédant l'indice rct 40 —.

On a isolé, par la méthode des colonies négatives de virus de différents passages, des clones dont les propriétés sont très différentes de celles du virus non cloné (Tabl. IV).

Les recherches sur la mutabilité expérimentale et la génétique du virus aphteux font actuellement une place particulière à l'étude des caractères génétiques du virus et de leur corrélation avec la virulence pour les animaux réceptifs. Nous avons étudié la manifestation phénotypique des propriétés du virus ayant subi des passages dans différents systèmes, suivant les indices indiqués précédemment. L'analyse de ces données (Tabl. V) montre que la modification d'un caractère n'entraîne pas obligatoirement celle des autres.

Les variantes avirulentes « froides » des deux souches de virus se sont montrées stables dans les passages lorsque les conditions étaient pour elles optimales.

TABLEAU III

Analyse clonale de la population virale de différents passages.

ESPÈCE de culture	VIRUS	NOMBRE de clones obtenus	INDICES					
			rct40 +	rct40 —	Vm +	Vm —	S petits (2mm)	S grands (5mm)
			souche 5 5 0					
SPEV	Initial 50/37°	24 9	23 8	1 1	24 8	0 1	9 8	15 1
SPEV	100/37° 65/50°	17 13	16 0	1 13	15 13	2 0	7 13	10 0
BP	Initial 80/37° 80/25°	10 12 8	10 11 0	0 1 8	10 12 7	0 0 1	0 0 0	10 12 8
			souche 6 6 3					
BP	5/37° 84/24°	8 10	8 0	0 8	8 3	0 5	3 10	5 —

TABLEAU IV

Propriétés des clones isolés de différents passages de virus par la méthode des plages.

Nos	VIRUS et clones isolés	INDICES					
		Vg	Vm	rct 40	S % petits	S % grands	Vb
		souches 5 5 0					
I	SPEV 4/37° (passage direct)	+	+	+	10,9	89,1	+
	clones 4 BB	+	+	+	0,0	100,0	+
	N° 24 ...	—	+	—	100,0	0,0	—
II	SPEV 100/37° (passage direct)	±	+	+	96,4	3,6	+
	clone 5 BB. ...	±	+	—	0,0	100,0	±
III	BP 80/25° (passage direct)	±	+	—	0,0	100,0	+
	clone N° 4	±	—	—	0,0	100,0	±
		souche 6 6 3					
IV	BP 84/24° (passage direct)	+	+	—	100,0	0,0	+
	clone N° 32	—	—	—	100,0	0,0	—

TABLEAU V

Rapport entre le caractère pathogène des variantes modifiées du virus aphteux et certains indices.

SYSTÈME de culture	clones	INDICES					
		Vb	rct 40	Vg	Vm	VM	S (mm)
		souche 550					
SPEV	Initial	+	+	+	+	—	1,0
	N° 1	+	+	+	+	—	0,5
	N° 2	+	—	—	+	—	1,0
	N° 3	—	—	—	+	—	1,0
	N° 4	+	—	—	+	—	0,5
	N° 5	—	—	—	+	—	0,2
	N° 6	—	+	+	+	—	*
		souche 663					
BP	Initial	+	+	+	+	*	0,5-4,0
	N° 22	—	—	—	+	*	0,5-1,5
	N° 32	—	—	—	—	*	0,5-1,5

* : La recherche n'a pas été effectuée.

L'adaptation des variantes atténuées « froides » du virus aphteux à une température élevée de culture a été accompagnée de la réapparition de certains indices, propres à la souche virulente (Tabl. VI).

TABLEAU VI

Etude des propriétés de la variante « froide » du virus aphteux (souche 663) lorsqu'on élève la température de culture dans une culture de cellules de B P.

PASSAGES du virus	Titrage en log. DICT 50/ml à :				log. DL 5P/ml	Vg		Vb	
	24°	30°	37°	40°		P	G	P	G
Atténué (BP 117)	6,5	6,7	0	0	0	0	0	0	0
30°-10 passages ..	4,2	6,3	0	0	4,3	0	0	0	0
30°-20 passages ..	4,2	6,7	0	0	6,2	+	0	+	0
30°-5 passages. .. 34°-6 passages. ..	*6,0	6,5	5,5	0	5,2	+	0	+	0
30°-5 passages ... 34°-5 passages ... 37°-7 passages. ..	+ +5,0	6,7	6,3	4,5	5,5	+	+	+	+

Note : P : processus primaire.
G : généralisation.

Ainsi, les résultats obtenus indiquent une corrélation relative entre la virulence du virus aphteux pour les animaux réceptifs et certains caractères qui le marquent, ce qui est confirmé par la littérature. La manifestation phénotypique des propriétés du virus dépend aussi bien des particularités des souches que du système de culture .

Parmi les variantes atténuées obtenues, c'est surtout celles qui provoquaient chez une partie des animaux des aphtes abortifs, lors de l'inoculation dans l'épithélium lingual, qui possédaient des propriétés immunogènes accusées pour les bovins. Un grand nombre d'entre elles étaient inoffensives

lorsqu'on les injectait sous la peau et n'étaient pas contagieuses pour les animaux non vaccinés.

Par ses propriétés immunogènes, la variante de la souche 663 atténuée dans une culture de BP à 24° C avait une certaine supériorité sur la variante analogue de la souche 550. La première d'entre elles avait suscité une immunité intense chez 75 p. 100 des animaux vaccinés, avec un titre d'anticorps neutralisants de 1 : 64 à 1 : 256, et la seconde n'a protégé que 43 p. 100 des animaux vaccinés, chez lesquels le titre des anticorps oscillait entre 1 : 8 et 1 : 32.

On a observé chez les bovins vaccinés par des souches modifiées un certain rapport entre l'excrétion virale, la virémie et le degré d'atteinte pathogène.

Les souches à réactivité résiduelle provoquaient chez les animaux une virémie et une excrétion de virus avec la salive, plus accusées chez les animaux auxquels on avait inoculé le virus dans l'épithélium lingual. Les souches complètement atténuées ne provoquaient chez la plupart des animaux vaccinés ni virémie ni excrétion de virus, ou bien le virus n'était présent qu'à l'état de trace. En règle générale, ces animaux n'avaient pas acquis une immunité suffisante.

Le passage du virus aphteux de type O (souche OP-13) à une température de 37° C, 27° C, 24° C, dans une culture de cellules de BP, a produit une variante atténuée (90 passages) caractérisée par les indices suivants : Vb —, Vg ±, rct 37 —, rct 40 —, Vm —, S + (1,5-2 mm).

Lors de la contamination expérimentale, cette variante fut avirulente pour les bovins, les ovins et les porcins soumis à une inoculation intramusculaire ou hypodermique et elle n'était pas non plus contagieuse.

On est parvenu à isoler le virus dans le sang des bovins 3 à 6 jours après la vaccination. Sur les 32 têtes de bétail vacciné, lors de l'inoculation de contrôle dans la langue (10^4 DL_{50}), deux animaux ont eu une atteinte primaire et un, avec une généralisation du processus. Chez la plupart des animaux, le titre des anticorps neutralisants était supérieur à 1 : 128. Des données analogues ont été obtenues lors de la vaccination d'ovins. Une série expérimentale de virus-vaccin a été inoculée à des bovins dans certaines exploitations atteintes de Fièvre aphteuse ou menacées de l'être.

Les résultats de ces expériences ont montré la grande efficacité épizootologique de l'utilisation de ce vaccin. Au quatrième ou cinquième jour suivant la vaccination, l'excrétion cessait généralement chez les animaux malades. Au bout de huit mois (délai d'observation), un titre élevé d'anticorps neutralisant le virus subsistait chez les animaux vaccinés (1 : 64, 1 : 128).

En conclusion des recherches effectuées, nous sommes convaincus une fois de plus de la nécessité d'une étude détaillée de la composition et des particularités génétiques de la population virale des souches modifiées, de la corrélation entre les caractères génétiques et la virulence, des mécanismes et des processus d'immunogénèse chez les animaux vaccinés.

L'étude de ces problèmes déterminera la nature du produit, la stratégie et la tactique de son utilisation, l'attitude de principe à l'égard de l'ensemble du problème des vaccins vivants contre la Fièvre aphteuse.

Selon nous, il convient également de prêter une attention particulière à l'étude du problème du taux de pouvoir réactogène admissible pour le virus-vaccin. Il est incontestable que le pouvoir réactogène ne doit pas présenter de danger épizootologique. Il est peu probable qu'un virus-vaccin provenant d'une souche ayant entièrement perdu son pouvoir réactogène soit capable de susciter une immunité suffisamment intense.

— · —— —